

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим катехоламиновые производные, и их применению в терапии.

Уровень техники

Такие нейродегенеративные заболевания, как болезнь Альцгеймера и Хантингтона приобретают все большее распространение со старением населения. Одним конкретным нейродегенеративным заболеванием, которое обычно развивается в возрасте между 50 и 80 годами, является болезнь Паркинсона (БП). БП представляет собой поражение мозга, которое характеризуется трепором и затрудненностью при ходьбе, движении и координации.

Дофамин (ДА) является нейромедиатором, который используется в клетках мозга для передачи импульсов для контроля или регулирования сокращения периферических мышц. Полагают, что БП вызывается прогрессирующей дегенерацией дофаминергических нейронов в компактной части черной субстанции головного мозга. Дегенерация дофаминергических нейронов приводит к снижению количества ДА в головном мозге. Полагают, что данный процесс нарушает функции нервных клеток, так что импульсы не передаются должным образом, приводя к потере мышечного контроля и функции.

В настоящее время не существует лечения, останавливающего прогрессирование БП. Лечение обычно направлено на контролирование симптомов БП, в первую очередь, путем замещения ДА на лево-3,4-дигидроксифенилаланин (L-ДОФА), который в результате метаболизма превращается в ДА, или путем введения химических агентов, которые стимулируют ДА-рецепторы. Данные рецепторы подразделяются на два обширных класса, рецепторы D1-типа и D2-типа. Первый класс подразделяется на D1- и D5-рецепторы, в то время как семейство D2-рецепторов состоит из D2-, D3- и D4-рецепторов.

Известно, что некоторые гидроксилированные (фенолы или катехолы) фенилэтиламины (сами по себе или являющиеся частью полужесткой/жесткой кольцевой системы) обладают дофаминергической активностью, по меньшей мере, на моделях животных. Однако их клиническое применение ограничено, поскольку они обладают низкой или не обладают биологической доступностью при пероральном применении, вероятнее всего благодаря их высокому метаболизму первичного прохождения. Однако Апоморфин, который принадлежит к этому классу соединений, применяется в клинике при лечении БП, хотя и не доставляется перорально (обычно путем периодического подкожного введения или непрерывной инфузии в течение дня). В настоящее время проводятся несколько клинических исследований альтернативной стратегии доставки для лечения Апоморфином при БП, например, лекарственных форм для интраназального и сублингвального введения. Однако данные усилия еще не привели к альтернативному варианту клинического лечения БП.

Прямые агонисты ДА-рецепторов способны активировать ДА-ауторецепторы, а также постсинаптические ДА-рецепторы. По-видимому, преобладает влияние ауторецепторной стимуляции, когда, например, Апоморфин вводится в низких дозах, тогда как при более высоких дозах снижение переноса ДА перевешивается за счет увеличения стимуляции постсинаптических рецепторов. Антипсихотическое действие на человека низких доз, например, Апоморфина вероятно обусловлено ауторецепторной стимуляцией (для обсуждения данных клинических исследований см. Tamminga; J. Neurol. Trans., 109(3), 411 (2002)).

L-ДОФА является эффективным лекарственным средством при БП (предшественник дофамина) с не очень хорошим ФК-профилем, приводящим к дискинезии и другим ответным изменениям. Селективные D2-агонисты (например Прамиксепол) реже вызывают дискинезии, но теряют эффективность на поздней стадии БП и с течением времени нуждаются в дополнении или замене на L-ДОФА. L-ДОФА и Апоморфин являются в настоящее время наиболее эффективными лекарственными средствами при БП и осуществляют стимулирование как D1-, так и D2-рецепторов.

Как упоминалось выше, низкая биодоступность при пероральном применении катехоламинов препятствует их клиническому применению в качестве пероральных лекарственных средств. Родственные фенольные амины обладают аналогичной низкой биодоступностью при пероральном применении, ограничивающей их клиническое применение в качестве активных при пероральном применении лекарственных средств. Однако Ротиготин, который принадлежит к этому классу соединений, был недавно рекомендован в качестве нового лекарственного средства при БП, основанного на трансдермальной доставке. В случае Апоморфина, исследования на животных показали, что трансдермальная доставка или с помощью имплантатов может являться возможными способами введения. Однако, когда исследовали доставку Апоморфина из имплантатов у обезьян [F. Bibbiani, L. C. Constantini, R. Patel, T.N. Chase Experimental Neurology 2005, 192, 73], было обнаружено, что в большинстве случаев животные должны были подвергаться лечению иммунодепрессантом Дексаметазоном для предотвращения местно раздражающего действия и других осложнений после операции по имплантации. Трансдермальная доставка Апоморфина также была связана с местным раздражением и окрашиванием кожи.

Помимо БП другими заболеваниями, при которых может быть благоприятным усиление дофаминергической передачи, являются болезни старческого возраста, благодаря предотвращению брадикинезии и депрессии и улучшению психических функций, включая различные аспекты познавательной способности, как описано выше. Может иметь положительный эффект у пациентов в депрессии и может

применяться при ожирении в качестве анорексигенного средства. Может способствовать улучшению при минимальной мозговой дисфункции (ММД), нарколепсии и вероятно негативных, позитивных, а также когнитивных симптомах шизофрении. Синдром беспокойных ног (СБН) и синдром периодических движений конечностями (СПДК) являются другими показателями, которые подвергаются клиническому лечению с помощью ДА-агонистов. Кроме того, также, по-видимому, улучшается состояние при импотенции и эректильной дисфункции посредством лечения с ДА-агонистами. Таким образом, улучшение сексуальных функций как у женщин, так и мужчин является другим возможным показанием для лечения с помощью ДА-агонистов после эректильной дисфункции (импотенции у мужчин) и сексуальная стимуляция, например, у женщин при менопаузе (стимуляция смазывания влагалища и эрекции клитора), вероятно, может быть достигнута посредством ДА-рецепторной стимуляции. В этой связи стоит отметить, что Апоморфин, когда дается сублингвально, применяется в клинике для улучшения состояния при эректильной дисфункции. Клинические исследования терапии L-ДОФА и D2-агонистом Прамипексолом при болезни Хантингтона показали многообещающие результаты; таким образом, лечение болезни Хантингтона является другим потенциальным применением соединений по настоящему изобретению. ДА вовлечен в регулирование сердечно-сосудистой и почечной системы, и соответственно почечная недостаточность и гипертензия могут считаться другими показаниями для соединений по изобретению.

Альтернатива лекарственным формам катехоламинов для неперорального применения включает в себя применение пролекарств. Проблема, связанная с разработкой таких соединений для клинического применения, заключается в сложности, связанной с предсказанием превращения в сам катехоламин у человека. В литературе представлены различные пролекарства катехоламинов, представляющие собой сложные эфиры, такие как покрытые энтеросолюбильной оболочкой сложные эфиры NPA для дуоденальной доставки [см., например, Wikstrom, Dijkstra, Cremers, Ivo; WO 02100377] и D1-подобный агонист Адроголид (Adrogolide, ABT-431; DAS-431, диацетильное пролекарство A-86929). Адроголид подвергается высокому метаболизму при первичном прохождении через печень у человека после перорального введения дозы и в результате имеет низкую биодоступность при пероральном введении (приблизительно 4%). У пациентов с БП введенный внутривенно (в/в) Адроголид обладает антипаркинсонической эффективностью, сравнимой с таковой для L-ДОФА [Giardina, Williams; CNS Drug Reviews, 7, 305 (2001)]. Альтернативный подход предусматривает "защиту" двух гидроксильных групп у катехола в виде соответствующего метилендиокси (МДО) ацетала в виде ацетала, полученного из отличного от формальдегида альдегида, или в виде кетала, полученного из различных кетонов. О данном принципе получения пролекарства сообщалось для Апорфинов более 20 лет назад [Baldessarini, Ram, Neumeyer; Neuropsychopharmacology, 21(10), 953 (1982)]. Из этих возможных пролекарств для Апоморфина и родственных соединений только пролекарство, полученное из N-н-пропил-Апоморфина (NPA) и формальдегида, демонстрировало значительную эффективность на животных моделях БП. За следующие 25 лет данные результаты не привели к лекарственному средству для БП, основанному на МДО-защищенных Апоморфинах или родственных соединениях.

Несмотря на многолетний интерес в данной области, очевидно, по-прежнему существует неудовлетворенная потребность относительно разработки эффективных, хорошо переносимых и перорально активных лекарственных средств для лечения БП. Смешанный D1-подобный/D2-подобный агонист, дающий длительную дофаминергическую стимуляцию, может удовлетворить такую неудовлетворенную потребность.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям на основе новых катехоламиновых производных, которые, как обнаружили авторы изобретения, могут являться подходящей заменой современным продаваемым препаратам для терапии нейродегенеративных заболеваний, таких как БП и болезнь Хантингтона, и препаратам для терапии по другим показаниям, обсуждаемым здесь, таким как, например, дискинетические расстройства, когнитивное расстройство и синдром беспокойных ног (СБН), и соединений, которые являются их *in vivo* метаболизируемыми пролекарствами.

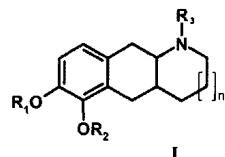
Когнитивное расстройство может происходить у нескольких групп пациентов, например пациентов с шизофренией, депрессией или психически больных и пациентов с синдромом дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ), болезнью Паркинсона, умеренным когнитивным расстройством (УКР), деменцией, тревожностью, возрастным нарушением памяти, болезнью Альцгеймера или посттравматическим стрессовым расстройством и пациентов, принимающихベンゾдиазепины или трициклические антидепрессанты, и в ряду нейродегенеративных заболеваний помимо болезни Паркинсона и болезни Альцгеймера. Выражение "когнитивное расстройство" относится к затруднениям в отношении внимания, обучения, памяти и регуляторной функции (соответствующие реакции на внешние стимулы). Они могут включать в себя нарушение внимания, дезорганизованное мышление, замедленное мышление, затрудненность понимания, снижение концентрации, снижение способности решать проблему, снижение памяти, затрудненность в выражении мыслей и/или затрудненность в обобщении мыслей, чувств и поведения и торможении несоответствующих (неадекватных) мыслей, а также внимание и активность, речевое обучение и память, визуальное обучение и память, скорость обработки информации и социальное познание.

Целью настоящего изобретения является обеспечение новых соединений, которые представляются

собой как D1-подобными, так и D2-подобными агонистами и которые могут применяться при лечении неврологических и психиатрических заболеваний.

Дополнительной целью настоящего изобретения является обеспечение новых соединений для перорального введения при лечении БП и других заболеваний или расстройств, которые положительно отвечают на усиленную дофаминергическую передачу.

Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество соединения формулы I и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей и вспомогательных веществ, где соединение формулы I имеет следующую структуру:



где $n = 0$;

R_1 и R_2 независимо выбирают из водорода, C_{1-6} -алконоила, фенилацетила или бензоила;

R_3 выбирают из группы, состоящей из водорода, метила, этила, н-пропила, циклопропила, циклобутила, аллила, пропаргила, гидроксиэтила, 3-фторпропила и 2-фторэтила, и

его фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли.

C_{1-6} -алконоильная группа подразумевает неразветвленную или разветвленную алконоильную группу, содержащую от 1 до 6 атомов углерода, примеры которой включают в себя формильную группу, ацетильную группу, пивалоильную группу и т.п.

В конкретном примере осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции на основе соединения формулы I, где R_3 выбирают из группы, состоящей из водорода, метила, этила, н-пропила, аллила и пропаргила.

В другом конкретном примере осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции на основе соединения формулы I, где R_3 выбирают из группы, состоящей из циклопропила, циклобутила и гидроксиэтила.

В конкретном примере осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции на основе соединения формулы I, отличающейся наличием, по существу, чистого транс-диастереоизомера соединения формулы I.

В другом примере осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции на основе соединения формулы I, где по меньшей мере один из R_1 и R_2 является ацетилом.

В примере осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции на основе соединения формулы I, где по меньшей мере один из R_1 и R_2 является пивалоилом. В другом примере осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции на основе соединения формулы I, где по меньшей мере один из R_1 и R_2 является бензоилом или фенилацетилом.

В конкретном примере осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции на основе соединения формулы I, где соединение выбирают из

транс-1-метил-2,3,3a,4,9,9a-гексагидро-1Н-бензо[f]индол-5,6-диола,
цис-1-метил-2,3,3a,4,9,9a-гексагидро-1Н-бензо[f]индол-5,6-диола,
транс-1-н-пропил-2,3,3a,4,9,9a-гексагидро-1Н-бензо[f]индол-5,6-диола,
цис-1-н-пропил-2,3,3a,4,9,9a-гексагидро-1Н-бензо[f]индол-5,6-диола,
или их фармацевтически приемлемой кислотно-аддитивной соли.

В конкретном примере осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции на основе соединения формулы I, где R_1 и R_2 оба являются водородами и R_3 выбирают из группы, состоящей из водорода, метила, этила и н-пропила.

Изобретение дополнительно относится к фармацевтической композиции на основе соединения формулы I, где R_1 и R_2 оба являются C_{1-6} -алконоилом и R_3 выбирают из группы, состоящей из водорода, метила, этила и н-пропила.

В дополнительном аспекте изобретение обеспечивает применение фармацевтической композиции на основе соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой кислотно-аддитивной соли для получения лекарственного средства для лечения нейродегенеративных расстройств у млекопитающего.

В еще одном аспекте изобретение обеспечивает применение фармацевтической композиции на основе соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой кислотно-аддитивной соли для получения лекарственного средства для лечения болезни Паркинсона или болезни Хантингтона у млекопитающего.

Соединение формулы I, либо в виде свободного основания, либо в виде фармацевтически приемлемой кислотно-аддитивной соли, либо в виде фармацевтической композиции, может вводиться любым приемлемым способом, например перорально, буккально, сублингвально, неперорально или парентерально, и соединение может быть представлено в виде любой приемлемой формы для такого введения,

например перорально в форме таблеток, капсул, порошков, сиропов, растворов или дисперсий, неперорально в форме, например, трансдермальных пластырей или парентерально в форме дисперсий или растворов для инъекции. В одном примере осуществления соединение формулы I вводится в форме твердой фармацевтической субстанции, применимой в виде таблетки или капсулы.

Соединения формулы I образуют фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли с широким кругом органических и неорганических кислот. Такие соли также являются частью данного изобретения.

Фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли соединения формулы I образуются из фармацевтически приемлемой кислоты, что хорошо известно в данной области техники. Такие соли включают в себя фармацевтически приемлемые соли, перечисленные в Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2-19 (1977), и известны специалисту. Типичные неорганические кислоты, применяемые для образования таких солей, включают в себя хлорводородную, бромводородную, йодводородную, азотную, серную, фосфорную, гипофосфорную, метафосфорную, пирофосфорную и тому подобную. Соли, полученные из органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенилзамещенные алкановые кислоты, гидроксиалкановая и гидроксиалкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфоновые кислоты, могут также применяться. Такие фармацевтически приемлемые соли, таким образом, включают в себя хлорид, бромид, йодид, нитрат, ацетат, фенилацетат, трифторацетат, акрилат, аскорбат, бензоат, хлорбензоат, динитробензоат, гидроксибензоат, метоксибензоат, метилбензоат, о-ацетоксибензоат, изобутират, фенилбутират, α -гидроксибутират, бутин-1,4-дикарбоксилат, гексин-1,4-дикарбоксилат, капрат, каприлат, циннамат, цитрат, формиат, фумарат, гликолят, гептансоат, гиппурат, лактат, малат, малеат, гидроксималеат, малонат, манделат, мезилат, никотинат, изоникотинат, оксалат, фталат, терефталат, пропиолат, пропионат, фенилпропионат, салицилат, себакат, сукцинат, суберат, бензолсульфонат, п-бромбензолсульфонат, хлорбензолсульфонат, этилсульфонат, 2-гидроксиэтилсульфонат, метилсульфонат, нафталин-1-сульфонат, нафталин-2-сульфонат, нафталин-1,5-сульфонат, п-толуолсульфонат, ксиолосульфонат, тартрат и тому подобное.

Способы получения твердых фармацевтических препаратов также хорошо известны в данной области техники. Таблетки могут, таким образом, быть получены путем смешивания активного компонента с традиционными адьювантами, наполнителями и разбавителями и затем прессования смеси в подходящей таблеточной машине. Примеры адьювантов, наполнителей и разбавителей включают в себя микрокристаллическую целлюлозу, кукурузный крахмал, картофельный крахмал, лактозу, маннит, сорбит тальк, стеарат магния, желатин, лактозу, камеди и тому подобное. Может также применяться любой другой адьювант или добавка, такие как красители, ароматизатор, консерванты и так далее, при условии, что они совместимы с активными компонентами.

В частности, таблетированная лекарственная форма по изобретению может быть получена прямым прессованием соединения формулы I в смеси с традиционными адьювантами и разбавителями. Альтернативно, для прессования в таблетки может использоваться полученный путем влажного гранулирования или путем гранулирования из расплава гранулят соединения формулы I, необязательно в смеси с традиционными адьювантами или наполнителями.

Растворы соединения формулы I для инъекций могут быть получены путем растворения активного компонента и возможных добавок в части растворителя для инъекций, предпочтительно стерильной воде, доведения раствора до желаемого объема, стерилизации раствора и заполнения подходящих ампул или сосудов. Может быть добавлена любая подходящая добавка, традиционно применяемая в области техники, такая как регулирующие тоничность агенты, консерванты, антиоксиданты, повышающие растворимость агенты и так далее. Альтернативно, активный компонент, например, в виде свободного основания может быть растворен в усвояемом или неусвояемом масле, их смеси или подобном для получения депо-формы для внутримышечного введения, способной высвобождать активный компонент в течение длительного периода времени.

Фармацевтические составы соединения формулы I, которые используются при трансдермальном применении, такие как трансдермальные пластиры, могут необязательно содержать активаторы проникновения, способствующие переносу активного компонента через кожу.

В соответствии с другим аспектом, изобретение относится к фармацевтически приемлемым солям соединения, где соединение выбирают из

транс-1-метил-2,3,3a,4,9,9a-гексагидро-1Н-бензо[f]индол-5,6-диола,
цис-1-метил-2,3,3a,4,9,9a-гексагидро-1Н-бензо[f]индол-5,6-диола,
транс-1-н-пропил-2,3,3a,4,9,9a-гексагидро-1Н-бензо[f]индол-5,6-диола,
цис-1-н-пропил-2,3,3a,4,9,9a-гексагидро-1Н-бензо[f]индол-5,6-диола.

В конкретном примере осуществления изобретения млекопитающим является человек.

Терапевтически эффективное количество соединения формулы I, рассчитываемое в виде суточной дозы соединения формулы (I) выше в форме свободного основания, целесообразно, составляет между 0,01 и 125 мг/сутки, более целесообразно, между 0,05 и 100 мг/сутки, например, предпочтительно между 0,1 и 50 мг/сутки.

В конкретном примере осуществления суточная доза соединения формулы I составляет между 1 и

10 мг/сутки.

В другом примере осуществления суточная доза соединения формулы I составляет менее приблизительно 1 мг/сутки.

В отдельном примере осуществления суточная доза соединения формулы I составляет приблизительно 0,1 мг/сутки.

В дополнительном примере осуществления изобретение обеспечивает состав для перорального применения, содержащий от 0,001 до 125 мг соединения формулы I.

В дополнительном примере осуществления изобретение обеспечивает состав для перорального применения, содержащий от 0,001 до 0,1 мг соединения формулы I.

В дополнительном примере осуществления изобретение обеспечивает состав для перорального применения, содержащий от 0,01 до 1 мг соединения формулы I.

В дополнительном примере осуществления изобретение обеспечивает состав для перорального применения, содержащий от 0,1 до 10 мг соединения формулы I.

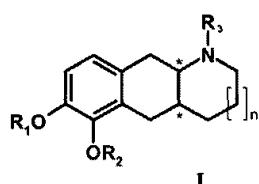
Чертежи

Фиг. 1: Кривая зависимости "доза-эффект" для концентрационно зависимой стимуляции внутриклеточного высвобождения Ca^{2+} под влиянием дофамина в hD5-трансфицированных клетках CHO-Ga16.

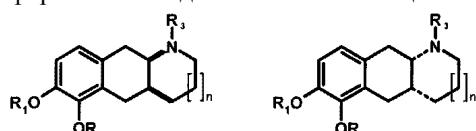
Фиг. 2: Кристаллическая структура соединения примера 2d2. Абсолютную конфигурацию определяли на основании аномального рассеяния "тяжелого" атома брома.

Подробное описание изобретения

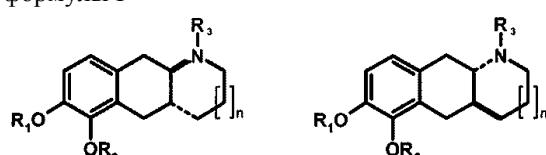
Соединения по настоящему изобретению имеют два хиральных центра (обозначены с помощью * в формуле ниже)



Соединения по изобретению поэтому могут существовать в двух различных диастереомерных формах, цис- и транс-изомеров, эти формы обе входят в объем настоящего изобретения.

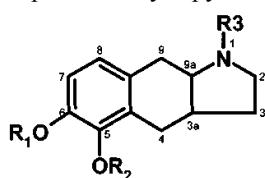


Цис-формы соединений формулы I



Транс-формы соединений формулы I

Кольцевые атомы соединения по изобретению нумеруются следующим образом:



Формула I, n=0

Диастереомерные формы каждая дополнительно содержат две энантиомерные формы, что подразумевает, что соединения формулы I в основном существуют в виде индивидуальных (R,R), (R,S), (S,S) и (S,R) энантиомеров.

Было найдено, что соединения формулы I ведут себя как перорально активные аналоги Апоморфина, что делает их потенциально полезными в отношении лечения болезни Паркинсона и других заболеваний/расстройств, которые положительно отвечают на усиленную дофаминергическую передачу.

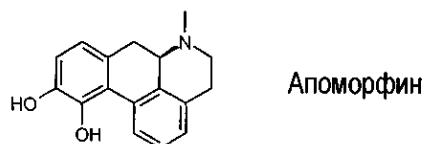
Согласно настоящему изобретению, было обнаружено вызывающее интерес нейрофармакологическое различие между двумя транс-энантиомерами недериватизированных катехоламинов формулы I (R_1 и $R_2=H$), которые были получены в энантиомерно чистом виде посредством способа текущего изобретения. Таким образом, было продемонстрировано, что (4aR,10aR)-энантиомеры являются активными, двойными D1/D2-агонистами со значениями $EC_{50} < 200 \text{ нМ}$ (см. Экспериментальную часть для описания используемых исследований *in vitro*), в то время как (4aS,10aS)-антагонисты являются намного менее ак-

тивными D1-агонистами и демонстрируют единственно умеренно сильный D2-агонизм.

Некоторые из (4aR,10aR)-энантиомеров соединений формулы I кроме того были протестированы на D5-аффинность и доказано, что являются очень активными D5-агонистами со значениями EC₅₀ < 10 нМ.

Рацемические соединения формулы I, для которых n=1, R₁ и R₂=водородом и R₃=водородом, метилом, этилом и н-пропилом, были ранее описаны [см., например, Cannon, Lee, Beres, Goldman; J. Heterocycl. Chem., 17, 1633 (1980)], и рассмотрена их дофаминергическая активность [см., например, Bradbury, Costall, Naylor; Neuropharmacology 23(9), 1025 (1984); Bradbury, Cannon, Costall, Naylor; Eur. J. Pharmacol. 105(1-2), 33 (1984)]. Сообщалось, что рацемическое соединение формулы I, для которого n=1, R₁ и R₂=водород и R₃=этил, стимулирует как D1-, так и D2-рецепторы [Itoh, Goldman, Kebabain; Eur. J. Pharmacol., 108 (1), 99 (1985)]. Однако ни в одном из данных документов предшествующего уровня техники не рассматривается энантиоселективность соединений формулы I или разные селективности, полученные в случае *in vitro* в сравнении с *in vivo*.

Как упомянуто ранее, соединение Апоморфин в настоящее время применяется в клинике при лечении БП. Апоморфин является смешанным D1-подобным/D2-подобным агонистом:



Когда соединения по изобретению тестировали *in vitro* и *in vivo* на их действие в отношении D1 и D2 рецепторов, их фармакологические профили очень отличались от такового для Апоморфина (более подробно см. Экспериментальную часть).

Было показано, что коэффициент селективности D1/D2 для модифицированных катехоламинов формулы I (R₁ и R₂=H) существенно изменяется при сравнении результатов измерений *in vitro* с *in vivo*. В случае исследований *in vitro* данные соединения являются значительно более активными в отношении D2-рецепторов, чем в отношении D1-рецепторов (как правило, с коэффициентом ~100). Однако коэффициент *in vivo* изменяется в сторону 2-10-кратной селективности. Таким образом, очевидно, что экстраполяция от данных *in vitro* до состояния *in vivo* не может быть проведена для соединения по изобретению.

Как упомянуто ранее, доступная в настоящий момент информация поддерживает гипотезу, что D1-подобный агонист (будь то селективный в отношении каждого подтипа или смешанный D1/D5-агонист) может иметь значительное практическое применение в лечении когнитивного расстройства при, например, психозе, БП и болезни Альцгеймера (БА), и болезни Хантингтона. Это может быть так в случае D1/D2-агонистов двойного действия, таких как соединения формулы I.

С учетом сложившейся ситуации, в частности, в случае фармацевтического применения, подразумевается, что когда определяется соединение формулы (I), которое является по существу энантиомерно или диастереомерно чистым, то соединение является относительно стереохимически чистым, предпочтительно избыток энантиомера или диастереомера составляет по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, и более предпочтительно по меньшей мере 80% (избыток энантомера 80% подразумевает, что соотношение, например, (4aR,10aR) к (4aS,10aS) составляет 90:10 в данной смеси), по меньшей мере 90%, по меньшей мере 96% или предпочтительно по меньшей мере 98%.

Экспериментальная часть

Общие методы.

Аналитические ЖХ/МС-данные были получены на приборе PE Sciex API 150EX, снабженном фотонизацией при атмосферном давлении (APPI) и ЖХ-системой Shimadzu LC-8A/SLC-10A. Чистоту определяли путем интегрирования кривых УФ (254 нм) и ELSD. МС-приборы были от PESciex (API), снабженные APPI-источником и работающие в режиме положительных ионов. Время удерживания в УФ-кривых (RT) выражали в мин. Раствор А получали из 0,05% ТФУ в воде, а раствор В получали из 0,035% ТФУ и 5% воды в ацетонитриле. Были использованы несколько различных методик:

Методика 14: API 150EX и ЖХ-система Shimadzu LC8/SLC-10A. Колонка: C-18 4,6×30 мм, 3,5 мкм (Symmetry, Waters). Температура колонки: комн. темп. Градиент: обращенная фаза с образованием ионных пар. Скорость потока: 2 мл/мин. Объем введенной пробы: 10 мкл. Градиент: 10% В в А до 100% В в течение 4 мин, затем 10% В в А в течение 1 мин. Общая продолжительность: 5 мин.

Методика 17: API 150EX и ЖХ-система Shimadzu LC8/SLC-10A. Колонка: C-18 4,6×30 мм, 4 мкм (Phenomenex Synergi Hydro). Температура: комн. темп. Градиент: обращенная фаза с образованием ионных пар. Скорость потока: 2 мл/мин. Объем введенной пробы: 10 мкл. Градиент: 2% В в А до 100% В в течение 4 мин, затем 10% В в А в течение 1 мин. Общая продолжительность: 5 мин.

Методика 25: API 150EX и ЖХ-система Shimadzu LC10AD/SLC-10A. Колонка: dC-18 4,6×30 мм, 3 мкм (Atlantis, Waters). Температура колонки: 40°C. Градиент: обращенная фаза с образованием ионных пар. Скорость потока: 3,3 мл/мин. Объем введенной пробы: 15 мкл. Градиент: 2% В в А до 100% В в течение 2,4 мин, затем 2% В в А в течение 0,4 мин. Общая продолжительность: 2,8 мин.

Методика 101: API 150EX и ЖХ-система Shimadzu LC8/SLC-10A. Колонка: C-18 4,6×30 мм, 3,5 мкм

(Symmetry, Waters). Температура колонки: 60°C. Градиент: обращенная фаза с образованием ионных пар. Скорость потока: 3,3 мл/мин. Объем введенной пробы: 15 мкл. Градиент: 10% В в А до 100% В в течение 2,4 мин, затем 10% В в А в течение 0,4 мин. Общая продолжительность: 2,8 мин.

Методика 102: API 150EX и ЖХ-система Shimadzu LC8/SLC-10A. Колонка: dC-18 4,6×30 мм, 3 мкм (Atlantis, Waters). Температура колонки: 40°C. Градиент: обращенная фаза с образованием ионных пар. Скорость потока: 3,3 мл/мин. Объем введенной пробы: 15 мкл. Градиент: 2% В в А до 100% В в течение 2,4 мин, затем 2% В в А в течение 0,4 мин. Общая продолжительность: 2,8 мин.

Методика 111: API 150EX и ЖХ-система Shimadzu LC8/SLC-10A. Колонка: C-18 4,6×30 мм, 3,5 мкм (Symmetry, Waters). Температура колонки: 60°C. Градиент: обращенная фаза с образованием ионных пар. Скорость потока: 3,3 мл/мин. Объем введенной пробы: 10 мкл (1 мкл инъецируемый непосредственно в колонку). Градиент: 10% В в А до 100% В в течение 2,4 мин, затем 10% В в А в течение 0,4 мин. Общая продолжительность: 2,8 мин.

Методика 314: API 150EX и ЖХ-система Shimadzu LC8/SLC-10A. Колонка: C-18 4,6×30 мм, 3,5 мкм (Symmetry, Waters). Температура колонки: комн. темп. Скорость потока 2 мл/мин. Объем введенной пробы 10 мкл. Градиент: 10% В в А в течение 4 мин, затем 100% В в течение 0,1 мин, затем 10% В в А в течение 0,9 мин. Общая продолжительность: 5,0 мин.

Методика 23 SUN: API 150EX и ЖХ-система Shimadzu LC8/SLC-10A. Колонка: C-18 4,6×30 мм, 3,5 мкм (Sunfire, Waters). Температура колонки: 40°C. Градиент: обращенная фаза с образованием ионных пар. Скорость потока: 3,3 мл/мин. Объем введенной пробы: 15 мкл. Градиент: 10% В в А до 100% В в течение 2,4 мин, затем 10% В в А в течение 0,4 мин. Общая продолжительность: 2,8 мин.

Препартивную очистку методом ЖХ/МС осуществляли на том же самом приборе с химической ионизацией при атмосферном давлении. Колонка: 50×20 мм YMC ODS-A с размером частиц 5 мкм. Метод: элюирование в линейном градиенте с 80% А до 100% В в течение 7 мин и со скоростью потока 22,7 мл/мин. Сбор фракций осуществляли с помощью МС-детекции разделения потока.

Реакции гидрирования осуществляли, используя либо стандартный шейкер Парра (Parr), либо прибор Endavour от Argonaut. Во всех случаях использовали низкое давление (давление водорода 1-5 бар (10^5 - 5×10^5 Па).

Термин "хроматография на силикагеле (EtOAc/гептан)" имеет следующее значение: подвергаемое очистке соединение обычно растворяли в небольшом количестве ДХМ и вносили в колонку, предварительно заполненную силикагелем, и элюировали смесью EtOAc и гептана, либо в изократическом режиме, либо с помощью градиента, такого как 0-100% EtOAc в гептане. Одним примером используемой колонки, заполняемой силикагелем, является "ISOLUTE SPE COLUMNS" [например, 20 г FLASH Si 70 мл от International sorbent technology]. Альтернативно, осуществляли классическую ручную хроматографическую очистку, используя силикагель [например, Machery-Nagel 60M; 0,04-0,063 мм, 230-400 меш], с осуществлением идентификации соединения путем анализа стандартным методом ТСХ на алюминиевых пластинах, предварительно покрытых силикагелем [например Merck 60 F₂₅₄]. Соединения визуализировали путем освещения с использованием УФ-лампы (254 нм) или путем обжигания после погружения в раствор молибдата аммония (6,25 г) и сульфата церия (IV) (2,5 г) в 10% водной серной кислоте (250 мл).

Микроволновое ускорение реакций осуществляли в герметично закрытых реакционных сосудах для микроволнового облучения. Эксперименты осуществляли на синтезаторе Smith от Personal Chemistry.

Термин "лиофилизовали" относится к сублимационной сушке вещества с использованием прибора Christ Apla 2-4 LSC от WWR International.

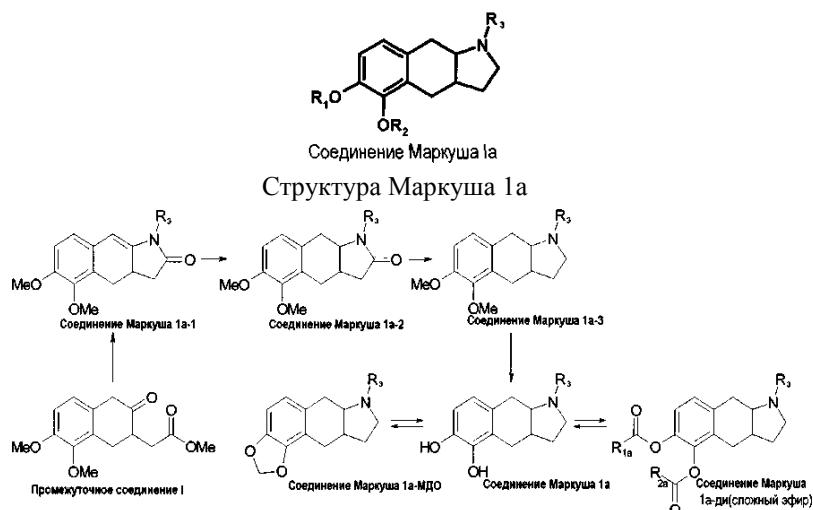
Термины "сушили (Na₂SO₄)" и "сушили (MgSO₄)" относятся к удалению воды из органического слоя путем добавления сухого Na₂SO₄ или MgSO₄, соответственно, с последующим перемешиванием в течение подходящего количества времени для обеспечения эффективного процесса сушки. Затем осадок удаляется путем фильтрования, и фильтрат обычно концентрируется в вакууме (см. ниже).

Термин "концентрировали в вакууме" имеет следующее значение: летучие компоненты удаляются из смеси с помощью стандартного роторного испарителя при пониженном давлении. Термин "сушили в вакууме при 40°C" относится к применению стандартного вакуум-сушильного шкафа при 40°C, связанного с масляным насосом. Термин "сушили в вакууме" относится к процессу сушки, в котором вещество, которое подвергается сушке, помещают в сосуд, связанный непосредственно с масляным насосом, на период времени, достаточный для удаления летучих компонентов.

Определения кристаллических структур рентгеноструктурным анализом осуществляли следующим образом. Кристалл соединений охлаждали до 120 К с применением системы охлаждения азотом Cryo-stream. Данные собирали на дифрактометре SMART Platform Siemens с двумерным чувствительным ПЗС-детектором. Структуры решали прямыми методами и уточняли методом наименьших квадратов плотно заполненной матрицы по F² всех данных. Атомы водорода в структурах не могут быть обнаружены в разностных картах электронной плотности. Неводородные атомы уточняли в анизотропном приближении. Все атомы водорода помещали в рассчитанные позиции с применением модели "наездника" с O-H=0,84, C-H=0,99-1,00, N-H=0,92-0,93 Å. Для всех атомов водорода фиксировали тепловые параметры [U(H)=1,2 U для присоединенного атома]. x-Параметры Флэка находятся в диапазоне 0,0 (1)-0,05(1), ука-

зываю на то, что абсолютные структуры являются корректными. Используемыми для сбора данных, обработки данных и поглощения программами были SMART, SAINT и SADABS [см. также "SMART и SAINT, Area Detector Control и Integration Software", Версия 5.054, Bruker Analytical X-Ray Instruments Inc., Мэдисон, США (1998), Sheldrick "SADABS, Program for Empirical Correction of Area Detector Data" Версия 2.03, University of Gottingen, Germany (2001)]. Программу SHELXTL [см. также Sheldrick "SHELXTL, Structure Determination Programs", Версия 6.12, Bruker Analytical X-Ray Instruments Inc., Мэдисон, США (2001)] использовали для решения структур и изображения молекул.

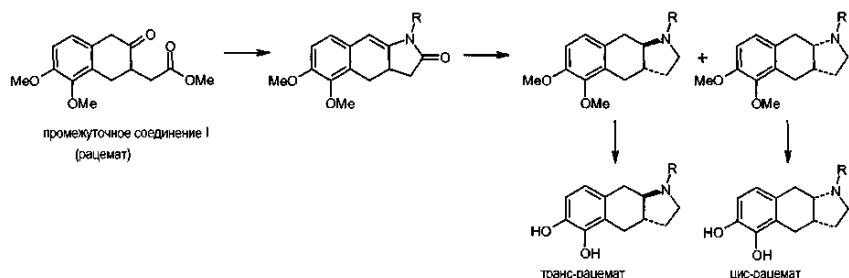
Общие методы синтеза для структуры Маркуша 1a



Исходя из промежуточного соединения I, чей синтез описан здесь, конденсация с первичным амином R_3NH_2 дает соединение Маркуша 1a-1 согласно условиям здесь для синтеза соединения 25 из промежуточного соединения I. Восстановление соединения Маркуша 1a-1 с помощью ЛАГ дает соединение Маркуша 1a-2, например, согласно условиям здесь для синтеза соединений 13 и 14. После разделения цис/транс-смеси, любой диастереомер может быть обработан 48% HBr или родственным реагентом для расщепления метоксигрупп, чтобы давать соединение Маркуша 1a, например, согласно условиям, описанным здесь для синтеза примера 1a1. Далее взаимодействие соединения Маркуша 1a с CH_2Cl_2Br или родственным реагентом в присутствии основания для получения соединения Маркуша 1a-МДО, например, согласно условиям, описанным здесь для синтеза примера 3b1. Полученное соединение Маркуша 1a-МДО может быть обратно превращено в соединение Маркуша 1a путем обработки $BCl_3/(n\text{-бутил})_4NI$ или родственным реагентом. Соединение Маркуша 1a может быть превращено в соединение Маркуша 1a-ди(сложный эфир) путем обработки соответствующими хлорангидридами кислот в ТФУ для получения соединения Маркуша 1a-ди(сложный эфир), например, как описано здесь для синтеза примера 4a1. Данное вещество может быть подвергнуто гидролизу до соединения Маркуша 1a.

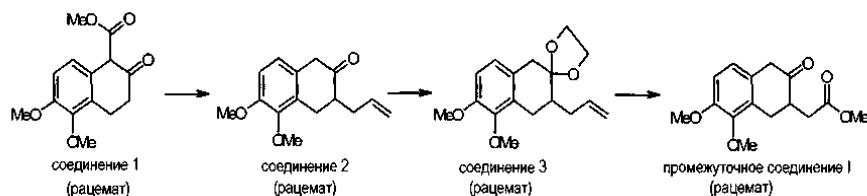
Следующий раздел общих методов синтеза для получения промежуточных соединений будет представлен следующими конкретными примерами.

Общая методика получения бензо[f]индолильных катехоламинов

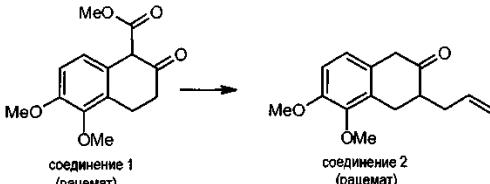


Промежуточное соединение I, чей синтез описан здесь, вводят во взаимодействие с первичным амином и полученный енаминлактам затем восстанавливали аланом и затем боргидридом натрия. Это дает смесь цис/транс защищенных бензо[f]индолильных катехоламинов. Данные диастереомеры разделяют, например, хроматографией на силикагеле [для примера близкого синтеза см.: Lin, Haadsma-Svensson, Phillips, Lahti, McCall, Piercey, Schreur, von Voigtlander, Smith, Chidester; J. Med. Chem., 36(8), 1069 (1993)]. Защищенный катехоламин подвергали удалению защиты, например, путем обработки 48% HBr или BBr_3 .

Получение промежуточного соединения I

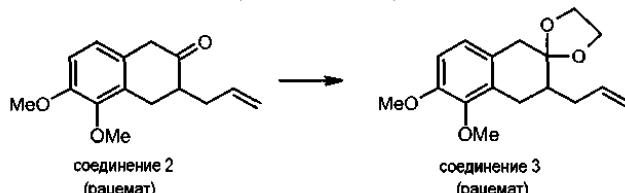


Рацемический 3-аллил-5,6-диметокси-3,4-дигидро-1Н-нафталин-2-он (соединение 2)



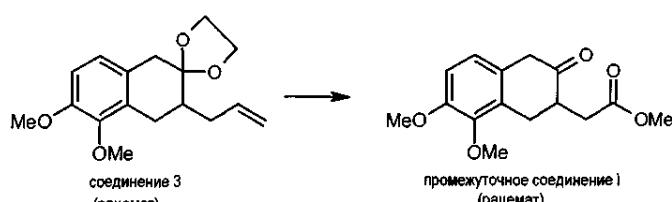
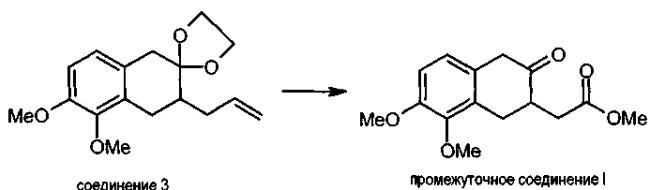
Раствор метилового эфира рацемической 5,6-диметокси-2-оксо-1,2,3,4-тетрагидронапталин-1-карбоновой кислоты (6,60 г) [соединение 1; полученное как описано у Taber, Neubert, Rheingold; J. Am. Chem. Soc., 124(42), 12416 (2002)] в ТГФ (25 мл) добавляли по каплям к раствору ЛДА (27 мл, 2М в ТГФ/гептане/этилбензоле) в ТГФ (125 мл) при 0°C. Раствор перемешивали при 0°C в течение 1,5 ч. Добавляли аллилбромид (3,44 мл) и раствор перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Добавляли Et₂O (300 мл) и 1М HCl (300 мл) и слои разделяли. Органический слой промывали насыщенным раствором соли, сушили ($MgSO_4$) и концентрировали в вакууме. Оставшееся масло растворяли в ДМСО (25 мл) и добавляли воду (2,5 мл) и LiCl (1 г). Реакционную смесь перемешивали при 150°C в течение 0,5 ч и затем охлаждали до комнатной температуры. Добавляли EtOAc (250 мл) и воду (250 мл) и слои разделяли. Водный слой экстрагировали EtOAc (125 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным раствором соли, сушили ($MgSO_4$) и концентрировали в вакууме. Сырой продукт очищали хроматографией на силикагеле (EtOAc/гептан) для получения 2,55 г соединения 2 в виде белого твердого вещества.

Рацемический 3'-аллил-5',6'-диметокси-3',4'-дигидро-1'Н-спиро[[1,3]диоксолан-2,2'-нафталин]
(соединение 3)



К перемешиваемому раствору соединения 2 (2,55 г) в ДХМ (45 мл) добавляли $CH(OCH_3)_3$ (4,53 мл), этиленгликоль (5,68 мл) и ПТСК (20 мг). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 4,5 ч и затем гасили, добавляя насыщенный водный раствор $NaHCO_3$ (45 мл). Органический слой промывали насыщенным раствором соли, сушили ($MgSO_4$) и концентрировали в вакууме. Сырой продукт очищали хроматографией на силикагеле (EtOAc/гептан) для получения 2,52 г соединения 3 в виде масла.

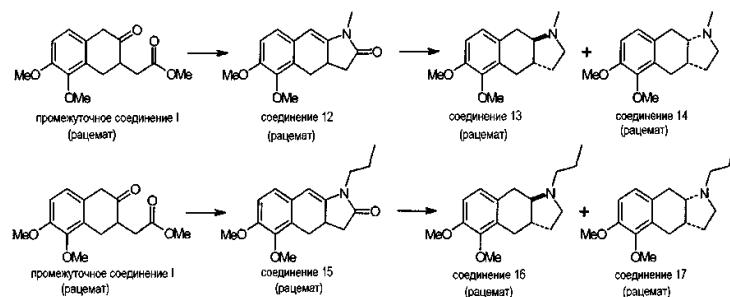
Рацемический 3-аллил-5,6-диметокси-3,4-дигидро-1Н-нафталин-2-он (промежуточное соединение I)



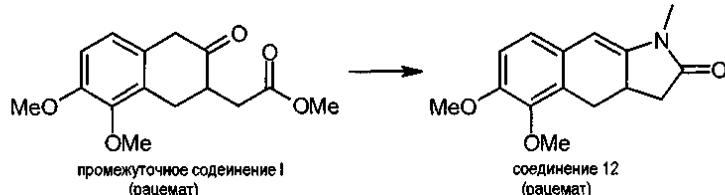
Добавляли $KMnO_4$ (4,75 г) к перемешиваемому раствору $NaIO_4$ (98 г) в воде (1,7 л) при комнатной температуре. Раствор перемешивали в течение 0,5 ч, после чего K_2CO_3 (12,7 г) и раствор перемешивали в

течение дополнительных 5 мин. Добавляли раствор соединения 3 (14,8 г) в трет-бутиловом спирте (500 мл). Раствор перемешивали 3 ч и затем охлаждали на бане лед/вода. Добавляли по каплям гидросульфит натрия (38-40% водный раствор) в течение 0,5 ч. Добавляли ДХМ (1л) и слои разделяли. Водный слой экстрагировали еще ДХМ (0,4 л) и объединенные органические слои промывали насыщенным раствором соли, сушили ($MgSO_4$) и концентрировали в вакууме с получением 11,3 г темного масла. Данное вещество растворяли в ацетонитриле (225 мл) и добавляли раствор $AcCl$ (37 мл) в $MeOH$ (190 мл). Раствор перемешивали 5 мин при комнатной температуре и затем держали при $4^{\circ}C$ в течение ночи, и затем перемешивали 2 ч при комнатной температуре. Добавляли воду (45 мл) и раствор перемешивали в течение 3 ч, после чего его концентрировали в вакууме. Сырой остаток очищали хроматографией на силикагеле ($EtOAc/гептан$) для получения 3,62 г промежуточного соединения I в виде масла.

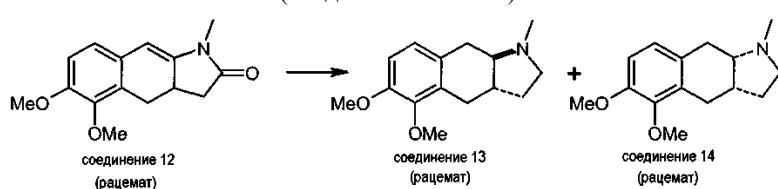
Получение соединений 12-17



Рациемический 5,6-диметокси-1-метил-1,3,3 a ,4-тетрагидробензо[*f*]индол-2-он (соединение 12)

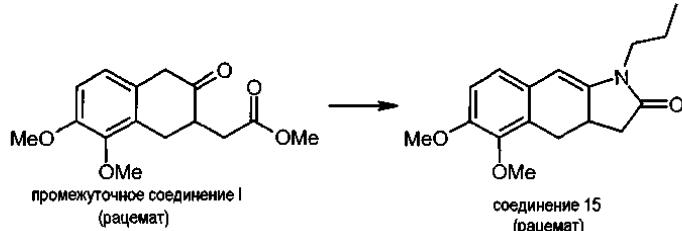


К перемешиваемому раствору промежуточного соединения I (830 мг) в толуоле (7 мл) в реакционном сосуде для микроволнового облучения добавляли раствор метиламина (0,75 мл, 8M в $EtOH$) и добавляли $AcOH$ (0,34 мл). Реактор герметично закрывали и смесь нагревали при $120^{\circ}C$ в течение 15 мин микроволновым облучением. Раствор концентрировали в вакууме и остаток сушили в вакууме. Сырой продукт очищали хроматографией на силикагеле ($EtOAc/гептан$). Выход: 210 мг соединения 12 в виде масла. Рациемические транс- и цис-изомеры 5,6-диметокси-1-метил-2,3,3 a ,4,9,9 a -гексагидро-1Н-бензо[*f*]индола (соединения 13 и 14)



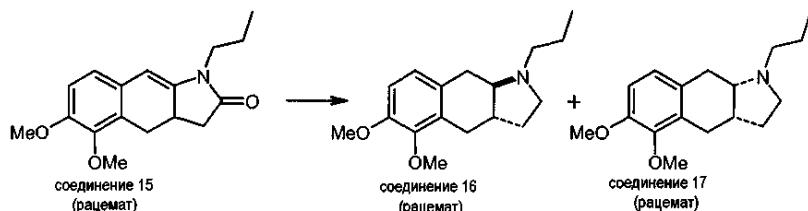
К перемешиваемому раствору ЛАГ (3,9 мл, 1M в ТГФ) при $0^{\circ}C$ добавляли $AlCl_3$ (174 мг). Смеси позволяли нагреться до комнатной температуры и затем охлаждали до $0^{\circ}C$ снова. К данной смеси добавляли соединение 12 (200 мг), растворенное в ТГФ (4 мл), и смесь перемешивали при комнатной температуре 1 ч. Смесь охлаждали до $0^{\circ}C$ и затем гасили, добавляя влажный Na_2SO_4 . Неорганические соли отфильтровывали и фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток растворяли в 99% $EtOH$ и добавляли $NaBH_4$ (146 мг), и раствор перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь гасили добавлением 2M водным HCl (3 мл). Большую часть летучих компонентов удаляли путем концентрирования в вакууме и остаток экстрагировали Et_2O . Органический слой экстрагировали более разбавленной HCl . Объединенные слои разбавленной HCl подщелачивали 9M $NaOH$ и затем экстрагировали Et_2O . Органический слой промывали насыщенным раствором соли, сушили (Na_2SO_4) и концентрировали в вакууме. Сырую смесь очищали хроматографией на силикагеле ($MeOH/EtOAc$). Выход: 4 мг соединения 13 в виде масла (медленно элюируемый изомер) и 32 мг соединения 14 в виде масла (быстро элюируемый изомер).

Рацемический 5,6-диметокси-1-н-пропил-1,3,3a,4-тетрагидробензо[f]индол-2-он (соединение 15)



Получали из промежуточного соединения I (1,39 г) по методике, описанной для соединения 12, используя н-пропиламин вместо метиламина. Выход соединения 15: 0,69 г в виде твердого вещества.

Рацемические транс- и цис-изомеры 5,6-диметокси-1-н-пропил-2,3,3a,4,9,9a-гексагидро-1Н-бензо[f]индола (соединения 16 и 17)

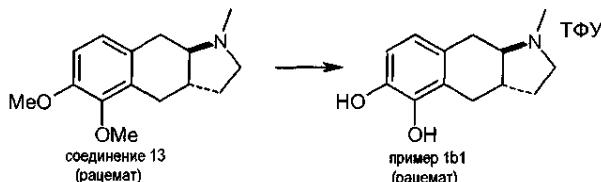


Соединения 16 и 17 получали аналогичным методом как соединения 13 и 14 из соединения 15 (400 мг) вместо соединения 12. Неочищенную смесь продукта очищали хроматографией на силикагеле (MeOH/EtOAc). Выход: 55 мг соединения 16 в виде масла (медленно элюируемый изомер) и 40 мг соединения 17 в виде масла (быстро элюируемый изомер).

Получение соединений по изобретению

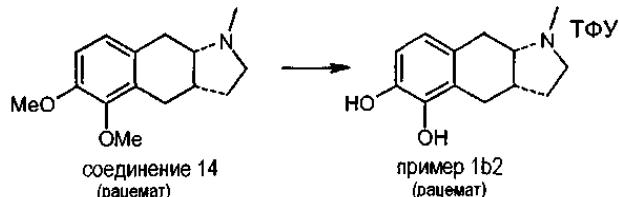
Раскрытое здесь изобретение дополнительно иллюстрируется следующими неограничивающими примерами:

1b1. Рацемический гранс-1-метил-2,3,3a,4,9,9a-гексагидро-1Н-бензо[f]индол-5,6-диола трифторацетат



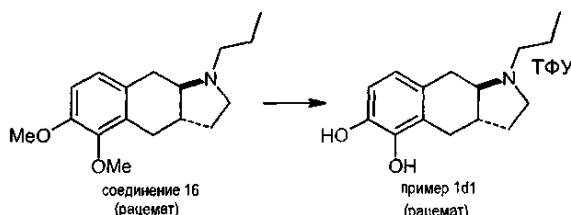
Соединение 13 (4 мг) суспендировали в 48% HBr (1 мл) и нагревали до 155°C в течение 0,5 ч в герметично закрытом реакционном сосуде для микроволнового облучения с помощью микроволнового излучения. Сырую смесь концентрировали в вакууме, и остаток очищали препаративной ЖХ/МС. Выход: 6 мг в виде белого твердого вещества. ЖХ/МС (методика 25): RT 0,52 мин, ELSD 94,1%, УФ 82,9%, МН⁺: 220,3.

1b2. Рацемический цис-1-метил-2,3,3a,4,9,9a-гексагидро-1Н-бензо[f]индол-5,6-диола трифторацетат



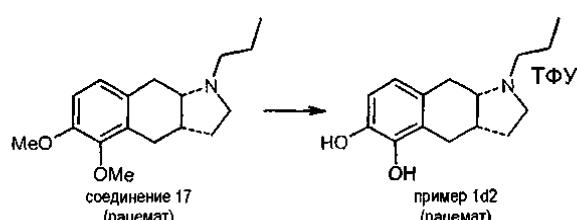
Соединение 14 (32 мг) суспендировали в 48% HBr (1,5 мл) и нагревали до 155°C в течение 0,5 ч в герметично закрытом реакционном сосуде для микроволнового облучения с помощью микроволнового облучения. Неочищенную смесь концентрировали в вакууме и остаток очищали препаративной ЖХ/МС. Выход: 23 мг в виде белого твердого вещества. ЖХ/МС (методика 25): RT 0,52 мин, ELSD 93,5%, УФ 92,7%, МН⁺: 220,2.

1d1. Рацемический транс-1-н-пропил-2,3,3a,4,9,9a-гексагидро-1Н-бензо[*f*]индол-5,6-диола трифтор-ацетат



Соединение 16 (55 мг) суспендировали в 48% HBr(2 мл) и нагревали до 155°C в течение 0,5 ч в герметично закрытом реакционном сосуде для микроволнового облучения с помощью микроволнового облучения. Неочищенную смесь концентрировали в вакууме и остаток очищали препаративной ЖХ/МС. Выход: 30 мг в виде белого твердого вещества. ЖХ/МС (методика 25): RT 0,69 мин, ELSD 99,7%, УФ 97,9%, МН⁺: 248,2.

1d2. Рацемический цис-1-н-пропил-2,3,3a,4,9,9a-гексагидро-1Н-бензо[*f*]индол-5,6-диола трифтор-ацетат



Соединение 17 (40 мг) суспендировали в 48% HBr (2 мл) и нагревали до 155°C в течение 0,5 ч в герметично закрытом реакционном сосуде для микроволнового облучения с помощью микроволнового облучения. Неочищенную смесь концентрировали в вакууме и остаток очищали препаративной ЖХ/МС. Выход: 8 мг в виде белого твердого вещества. ЖХ/МС (методика 25): RT 0,69 мин, ELSD 99,1%, УФ 97,8%, МН⁺: 248,3.

Аббревиатуры и список использованных химических реагентов

Были использованы следующие аббревиатуры. В данном параграфе также перечислены использованные химические реагенты вместе с их коммерческим источником (не включено для стандартных растворителей).

AcCl=ацетилхлорид (например, Aldrich 23,957-7), ACh=ацетилхолин, AcOH=уксусная кислота, BA=болезнь Альцгеймера, APMB (ADME)=абсорбция-распределение-метаболизм-выведение, Аллилбронид (например, Fluka 05870), AlCl₃=алюминия хлорид (например, Aldrich 29,471-3), α_D=удельное оптическое вращение, Br₃B=трибромид бора (использованный в виде раствора в ДХМ; Aldrich 17,893-4), Вос₂O=ангидрид Вос/ди-трет-бутилдикарбонат (например, Aldrich 19,913-3), насыщенный раствор соли=насыщенный водный раствор хлорида натрия, BCA=бычий сывороточный альбумин, (втор-бутил)литий (использованный в виде раствора в циклогексане; например, Aldrich 19,559-6), цАМФ=циклический аденоzinмонофосфат, целит=вспомогательный материал для фильтрования, CH₂BrCl=бромхлорметан (Aldrich 13,526-7), CH₃I=метилиодид/йодметан (например, Aldrich 28,956-6), клетки СНО=клетки яичника китайского хомячка, ClAcCl=хлорацетилхлорид (например, Aldrich 10,449-3), Cs₂CO₃=карбонат цезия (Aldrich 441902), CuI=йодид меди(I) (Aldrich 215554), циклобутанон (например, Aldrich C9,600-1), циклопропилметилбромид/(бромметил)циклопропан (Aldrich 24,240-3), DA=дофамин, D1=рецептор D1 дофамина, D2=рецептор D2 дофамина, D3=рецептор D3 дофамина, D4=рецептор D4 дофамина, D5=рецептор D5 дофамина, ДХМ=дихлорметан/метиленхлорид, 1,6-дигром-2-нафтол (например, Aldrich D4, 180-5), ДМФА=диметилформамид, ДМСО=диметилсульфоксид, L-ДОФА=лево-3,4-дигидроксифенилаланин, DOPAC=3,4-дигидроксифенилуксусная кислота (метаболит DA), EC₅₀=концентрация, требующаяся для индуцирования ответа, находящегося посередине между фоновым уровнем и максимальным ответом, для соединения, о котором идет речь, ELSD=детекция свето-рассеяния испаренного образца, Et₃N=триэтиламин, Et₂NH=диэтиламин, EtOAc=этилацетат, этил-2-хлорникотинат (например, ABCR AV20359), 99% EtOH=абсолютный этанол, этилмагнийбромид (используемый в виде 3M раствора в Et₂O; Aldrich 18,987-1), Et₂O=диэтиловый эфир, [(1-этоксициклогексипропил)окси]тритилемислан (Aldrich 332739), этиленгликоль=1,2-этандиол, 35% H₂O₂=35% водный раствор перекиси водорода (например, Aldrich 34,988-7). FLIPR=флуоресцентный планшетный спектрофотометр, ФТС=фетальная телячья сыворотка, ч=часы, 48% HBr=48% водный раствор бромводорода, 18%/37% HCl=18%/37% водный раствор хлорводорода, 1M HCl/2M HCl=1M/2M водный раствор хлорводорода (если конкретно не указано иное в виде 2M раствора в Et₂O, который является коммерчески доступным, например Aldrich 45,518-0). ГМФА=гексаметилфосфортиамид, ГВК=гомованилиновая кислота (метаболит DA), i=изо, ИБМК=3-изобутил-1-метилксантин, в.д.=внутренний диаметр, 1-

йодпропан (например, Aldrich 17,188-3), K_2CO_3 = карбонат калия (например, Aldrich 20,961-9), $KMnO_4$ =перманганат калия (например, Aldrich 39,912-4), KO =нонаутированный, ЛДА=литийдизопропиламид (используемый в виде раствора в ТГФ/гептан/этилбензол; Fluka 62491), ЖХ/МС=высокоэффективная жидкостная хроматография/масс-спектрометрия, ЛАГ=литийалюминогидрид (используемый в виде раствора в 1М ТГФ; Aldrich 21,277-6). $LiCl$ =хлорид лития (например, Aldrich 31,046-8), L-Selectride=три-втор-бутилборгидрид лития (используемый в виде 1М раствора в ТГФ; Aldrich 17,849-7). МДО=метилендиокси, МЭД=минимальная эффективная доза, МЭД_{немона-прида}=минимальная эффективная доза в присутствии Немонаприда (Nemonapride), $MeOH$ =метанол, метоксиacetилхлорид (например Aldrich M965-3), мин=минуты, ММД = минимальная мозговая дисфункция, 2-метил-ТГФ (например, Aldrich 41,424-7). МФТП=1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин, МТБЭ=метил-трет-бутиловый эфир, н=нормальный, $NaCNBH_3$ =цианоборгидрид натрия (Aldrich 15,615-9), $Na_2S_2O_3$ =бисульфит натрия (используемый в виде 38-40% водного раствора; например Riedel 13438), NaH =гидрид натрия (используемый в виде 60% дисперсии; Aldrich 45,291-2). $NaIO_4$ =периодат натрия (например, Aldrich 31,144-8), 1M/9M $NaOH$ =1M/9M водный раствор гидроксида натрия, $NaOMe$ =метилат натрия (используемый в виде приблизительно 5M раствора в метаноле; например Aldrich 15,625-6). NPA=N-н-пропилапоморфин, 6-ОНДА=6-гидроксиофамин. ФСБ=фосфатно-солевой буферный раствор (0,02 М натрий фосфатный буфер с 0,15 М хлоридом натрия, pH доведено до 7,4). БП=болезнь Паркинсона. ПФК=предфронтальная кора. Pd/C=палладий на угле (например, Aldrich 20,569-9), $Pd(OAc)_2$ =ацетат палладия(II) (Alfa Aesar 010516), пиперониловый спирт (например, Aldrich P4,940-6). ФК=фармакокинетика, СПДК=синдром периодических движений конечностями, пропаргилхлорид (например, Aldrich 14,399-5), пропионовый альдегид (например, Aldrich 58,812-4), ПТСК=паратолуолсульфоновой кислоты гидрат (например, Aldrich 40,288-5), PivCl=пивалоилхлорид/триметилацетилхлорид (например, Aldrich T7,260-5), СБН=синдром беспокойных ног, к.т.=комнатная температура, RT=время удерживания, втор=вторичный, насыщ. $NaHCO_3$ = насыщенный водный раствор гидрокарбоната натрия, насыщ. NH_4Cl =насыщенный водный раствор хлорида аммония, ПК=подкожное, СФХ=сверхкритическая фlesh-хроматография, металлический натрий (например, Aldrich 28,205-7). Трет = третичный, TBAI=йодид тетра-н-бутиламмония (например, Aldrich 14,077-5). ТФУ=трифтормукусная кислота, TFAA = трифтормукусной кислоты ангидрид, ТГФ=тетрагидрофуран (высушенный над молекулярными ситами 4Å), TCX=тонкослойная хроматография, CH (OCN_3)₃=триметилортогоформиат (например, Aldrich 30,547-2), УФ=чистота по ультрафиолетовому излучению (если не указано другое при 254 нм).

Фармакологические испытания D1 цАМФ-тестирование

Способность соединений к стимулированию или ингибированию D1-рецепторопосредованного образования цАМФ в клетках CHO, стабильно экспрессирующих рекомбинантный D1-рецептор человека, определяли следующим образом. Клетки высевали в 96-луночные планшеты при концентрации 11000 клеток/лунку за 3 дня до эксперимента. В день эксперимента клетки один раз промывали предварительно нагретым буфером G (1 mM $MgCl_2$, 0,9 mM $CaCl_2$, 1 mM ИБМК (3-изобутил-1-метилксантин) в ФСБ (фосфатно-солевой буферный раствор)) и начинали тестирование путем добавления 100 мкл смеси 30 нМ А68 930 и тестируемого соединения, разведенного в буфере G (антагонизм), или тестируемого соединения, разведенного в буфере G (агонизм).

Клетки инкубировали в течение 20 мин при 37°C и реакцию останавливали путем добавления 100 мкл буфера S (0,1M HCl и 0,1 mM $CaCl_2$) и планшеты держали при 4°C в течение 1 ч. Добавляли 68 мкл буфера N (0,15M NaOH и 60 mM NaOAc) и планшеты встряхивали в течение 10 мин. Переносили 60 мкл реакции в планшеты cAMP FlashPlate (DuPont NEN), содержащие 40 мкл 60 mM ацетата натрия pH 6,2 и добавляли 100 мкл 1C mix (50 mM ацетат натрия pH 6,2, 0,1% азид натрия, 12 mM $CaCl_2$, 1% БСА (бычий сывороточный альбумин) и $0,15 \times 10^{-6}$ Ки (5550 Бк)/мл ^{125}I -цАМФ). После 18 ч инкубирования при 4°C планшеты промывали один раз и считывали в счетчике Wallac TriLux.

D2 цАМФ-тестирование

Способность соединений к стимулированию или ингибированию D2-рецепторопосредованного ингибирования образования цАМФ в клетках CHO, трансфицированный D2-рецептором человека, определяли следующим образом. Клетки высевали в 96-луночные планшеты при концентрации 8000 клеток/лунку за 3 дня до эксперимента. В день эксперимента клетки один раз промывали предварительно нагретым буфером G (1 mM $MgCl_2$, 0,9 mM $CaCl_2$, 1 mM ИБМК в ФСБ) и начинали анализ путем добавления 100 мкл смеси 1 мкМ хинпирола, 10 мкМ форсколина и тестируемого соединения в буфере G (антагонизм) или 10 мкМ форсколина и тестируемого соединения в буфере G (агонизм).

Клетки инкубировали 20 мин при 37°C и реакцию останавливали путем добавления 100 мкл буфера S (0,1M HCl и 0,1 mM $CaCl_2$) и планшеты держали при 4°C в течение 1 ч. Добавляли 68 мкл буфера N (0,15M NaOH и 60 mM ацетата натрия) и планшеты встряхивали в течение 10 мин. Переносили 60 мкл реакции в планшеты cAMP FlashPlate (DuPont NEN), содержащие 40 мкл 60 mM NaOAc pH 6,2, и добавляли 100 мкл 1C mix (50 mM ацетат натрия pH 6,2, 0,1% азид натрия, 12 mM $CaCl_2$, 1% БСА и $0,15 \times 10^{-6}$

Ки (5550 Бк)/мл ^{125}I -цАМФ). После 18 ч инкубирования при 4°C планшеты промывали один раз и считывали в счетчике Wallac TriLux.

D5-тестирование

Концентрационно-зависимая стимуляция высвобождения внутриклеточного Ca^{2+} под влиянием дофамина в hD5-трансфенированных клетках CHO-Ga16. Клетки загружали фтор-4, красителем - индикатором кальция, в течение 1 ч. Кальциевый отклик (изменение флуоресценции) наблюдали с помощью FLIPR (флуоресцентный планшетный спектрофотометр) в течение 2,5 мин. Максимальные отклики (EC_{50}) усредняли из двух ячеек для каждой экспериментальной точки и наносили на график с концентрациями лекарственного вещества (см. фиг. 1 для дофамина).

Кривые концентрационных эффектов для агонистов строили при добавлении различных концентраций к различным лункам, используя флуоресцентный планшетный спектрофотометр (FLIPR™) (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Кривые соответствовали сигмоидальному уравнению "доза-эффект" $I = I_{\max}/(1 + (\text{EC}_{50}/[\text{Агонист}]^n))$, где значение EC_{50} является концентрацией агониста, которая производила половину максимальной активации, и n представляет собой коэффициент Хилла. Подборы кривых осуществляли, используя программное обеспечение Graphpad Prism 4 (Сан-Диего, Калифорния).

D1/D2 анализ

Агонисты дофамина могут обладать активностью к либо D1-подобным рецепторам, D2-подобным рецепторам, либо обоим. Мы использовали ротационный отклик у крыс с односторонними 6-ОНДА-поражениями для оценки соединений на их способность стимулировать оба типа рецепторов и индуцировать вращение [Ungerstedt, Arbuthnott, Brain Res., 24, 485 (1970); Setler, Sarau, Zirkle, Saunders, Eur. J. Pharmacol., 50(4), 419 (1978);

Ungerstedt, Herrera-Marschitz, Jungnelius, Stahle, Tossman, Zetterstrom, в "Advances in Dopamine Research" (Kohsaka, Ed.), Pergamon Press, Oxford, p. 219 (1982)]. Эксперименты состояли из определения минимальной эффективной дозы (МЭД), чтобы индуцировать вращение в случае исследуемого соединения. После того, как МЭД было определено, второй эксперимент осуществляли, чтобы определить МЭД соединения для преодоления блокирования Немонапридом (МЭД_{немонаприд}). Немонаприд является D2-подобным антагонистом, который блокирует D2-подобный рецептор, поэтому любые наблюдаемые вращения могут зависеть от активности при D1-подобном рецепторе. В заключение, после того, как стала известна МЭД_{немонаприд}, проводили третий эксперимент, используя дозу МЭД_{немонаприд} и наблюдая эффект D1-подобного антагониста, только SCH 23390, D2-подобного антагониста, только Немонаприда и, в заключение, эффект комбинированного применения SCH 23390 и Немонаприда. Данный третий эксперимент подтверждал активность соединения в отношении обоих рецепторов, так как каждый антагонист в одиночку мог только частично ингибировать ротационный отклик, индуцируемый тестируемым соединением, в то время как применение комбинации полностью блокировало все вращения у крыс [Arnt, Hytell, Psychopharmacology, 85(3), 346 (1985); Sonsalla, Manzino, Heikkila, J. Pharmacol Exp. Ther., 247(1), 180 (1988)]. Данную модель валидировали, используя Апоморфин в качестве контрольно-проверочного соединения для смешанных D1-подобных/D2-подобных агонистов.

Модель для определения превосходства

Апоморфин и L-ДОФА способны реверсировать нарушение подвижности на модели сильного истощения дофамина у мыши. Как Апоморфин, так и L-ДОФА стимулируют D1- и D2-подобные рецепторы дофамина. Прамипексол, агонист D2-подобных рецепторов, является неэффективным в данной модели. Несколько указанных здесь соединений были протестираны в данной модели и показали профиль, аналогичный Апоморфину и L-ДОФА в том отношении, что они способны восстанавливать локомотцию у мышей. Таким образом, данные соединения "превосходят" другие соединения, такие как Прамипексол, мишенью которых являются только D2-подобные рецепторы.

Модель дискинезии

Исследовали дискинетический профиль нескольких соединений по изобретению, используя описанную в литературе животную модель [Lundblad, Andersson, Winkler, Kirik, Wierup, Cenci, Eur. J. Neurosci., 15(1), 120 (2002)]. В данной модели несколько соединений по изобретению приводили к меньшей дискинезии, чем L-ДОФА или Апоморфин у не подвергавшихся действию психотропных веществ животных. Несколько соединений по изобретению, кроме того, значительно больше уменьшали индуцированную L-ДОФА дискинезию, чем наблюдали при переводе животных с L-ДОФА на Прамипексол.

Методы - культура клеток

Конструкт экспрессии D5 человека (чD5) делали, используя модифицированный вектор pEXJ. Стабильная линия клеток, экспрессирующая промискуитетный белок Galphai6 G человека (CHO-Ga16), была куплена у Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния. Клетки выращивали в среде HAMS F-12 (Invitrogen, Карлсbad, Калифорния), содержащей 10% ФТС (фетальная телячья сыворотка), 1% L-глутамина и 1% пенициллин/стрептомицин (П/С), при 37°C в 5% CO₂. За 48 ч до тестирования клетки CHO-Ga16 кратковременно трансфенировали ДНК рецептора hD5, используя методику LIPOFECTAMINE Plus (Invitrogen, Карлсbad, Калифорния) и оставляли раста в течение 1 дня в сыворотке и П/С-свободной среде. За 24 ч до тестирования hD5-трансфенированные клетки CHO-Ga16 высевали с плотностью 10000 клеток на лунку в черные 384-луночные планшеты с прозрачным дном, предварительно обработанные поли-D-

лизином (Becton Dickinson, США). Затем клетки культивировали в среде для роста клеток HAMS F-12, содержащей 1,5% ФТС, 1% L-глутамина и 1% пенициллина/стрептомицина (П/С) при 37°C в 5% CO₂.

Методы - анализ активации внутриклеточного кальция

Для определения концентрации свободного внутриклеточного кальция ([Ca²⁺]_i) культуральную среду заменяли свежеприготовленным загрузочным буфером. Загрузочный буфер содержит 1X HBSS (Invitrogen), 20 мМ НЕРС (Sigma), 0,1% БСА (Sigma), 1,5 мкМ Фтор-4-АМ (Molecular Probes) и 2,5 мМ пробенецида (свежеприготовленный) (Sigma). Планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37°C и 5% CO₂ и промывали три раза отмывочным буфером. Промывочный буфер содержит те же компоненты, как в загрузочном буфере за исключением Фтор-4-АМ. Затем клетки помещали в флуоресцентный планшетный спектрофотометр (FLIPR™, Molecular Devices), чтобы контролировать флуоресценцию клеток до и после добавления различных соединений.

Интересующие соединения разводили в промывочном буфере до 4× конечной концентрации и отбирали аликовты в прозрачный круглодонный планшет. Возбуждали краситель при длине волн 488 нм, используя лазер на ионах аргона, и детектировали сигнал, используя эмиссию стандарта при 510-570 нм [Sullivan, Tucker, Dale, Methods Mol. Biol., 114, 125 (1999)]. Получали кривые концентрационного эффекта для агонистов путем добавления различных концентраций к различным лункам. Измеряли относительную флуоресценцию путем вычитания фоновой из максимальной флуоресценции после добавления лекарственного вещества. Затем данные собирали и анализировали с помощью программного обеспечения FLIPR™ и GraphPad Prism 4.

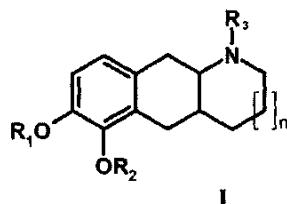
Антагонистическую активность соединений анализировали по ингибиции ими сигнала, вызываемого лигандами-агонистами. Клетки предварительно инкубировали с соединениями при увеличивающихся концентрациях и затем стимулировали с помощью агонистов, используя описанные выше методы.

Анализ *in vitro* гепатоцитов.

Замороженные собранные гепатоциты самца крысы (Sprague Dawley) и собранные гепатоциты человека у 10 доноров (мужчин и женщин) были куплены у Vitro Technologies Inc., ВА, США. Клетки размораживали при 31°C в водяной бане, живые клетки подсчитывали и высевали в общем количестве 100 мкл модифицированной по способу Дульбекко среды Игла (высокое содержание глюкозы) с 5 мМ буфера Нерес в 96-луночные планшеты с содержанием в каждой лунке 250000 и 500000 клеток/мл для гепатоцитов крысы и человека, соответственно. Инкубации начинали через 15 мин преинкубации и останавливали в моменты времени 0, 5, 15, 30 и 60 мин для гепатоцитов крыс и 0, 30, 60, 90 и 120 мин для гепатоцитов человека. Инкубации останавливали путем добавления равных объемов ледяного ацетонитрила, содержащего 10% 1М HCl. После центрифugирования инъецировали 20 мкл супернатантов в ВЭЖХ-колонку Atlantis dC18 3 мкм, 150×2,1 мм в.д. (Waters, Массачусетс, США). Подвижная фаза имела следующий состав: А: 5% ацетонитрила, 95% H₂O, 3,7 мл/л 25% водный NH₃, 1,8 мл/л муравьиной кислоты. Подвижная фаза В: 100% ацетонитрил и 0,1% муравьиной кислоты. Скорость потока была 0,3 мл/мин. Градиент устанавливали от 0 до 75% В с 5 по 20 мин и элюат анализировали, используя масс-спектрометр Q-TOFmicro (Waters, Массачусетс, США). Образование продукта/метаболита подтверждалось путем точного измерения масс и сравнения с синтезированным стандартом, дающим совпадающие времена удерживания.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество соединения формулы I и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей и вспомогательных веществ, где соединение формулы I имеет следующую структуру:



где n=0,

R₁ и R₂ независимо выбирают из водорода, C₁₋₆алканоила, фенилацетила или бензоила, R₃ выбирают из группы, состоящей из водорода, метила, этила, н-пропила, циклопропила, циклобутила, аллила, пропаргила, гидроксиэтила, 3-фторпропила и 2-фторэтила, и его фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, где R₃ выбирают из группы, состоящей из водорода, метила, этила, н-пропила, аллила и пропаргила.

3. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, где R₃ выбирают из группы, состоящей из циклопропила, циклобутила и гидроксиэтила.

4. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся наличием, по существу, чистого транс-диастереоизомера соединения формулы I.

5. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-4, где по меньшей мере один из R₁ и R₂ является ацетилом.

6. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-4, где по меньшей мере один из R₁ и R₂ является пивалоилом.

7. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-4, где по меньшей мере один из R₁ и R₂ является бензоилом или фенилацетилом.

8. Фармацевтическая композиция по п.1, где соединение выбирают из транс-1-метил-2,3,3a,4,9,9a-гексагидро-1H-бензо[f]индол-5,6-диола, цис-1-метил-2,3,3a,4,9,9a-гексагидро-1H-бензо[f]индол-5,6-диола, транс-1-н-пропил-2,3,3a,4,9,9a-гексагидро-1H-бензо[f]индол-5,6-диола, цис-1-н-пропил-2,3,3a,4,9,9a-гексагидро-1H-бензо[f]индол-5,6-диола или их фармацевтически приемлемой кислотно-аддитивной соли.

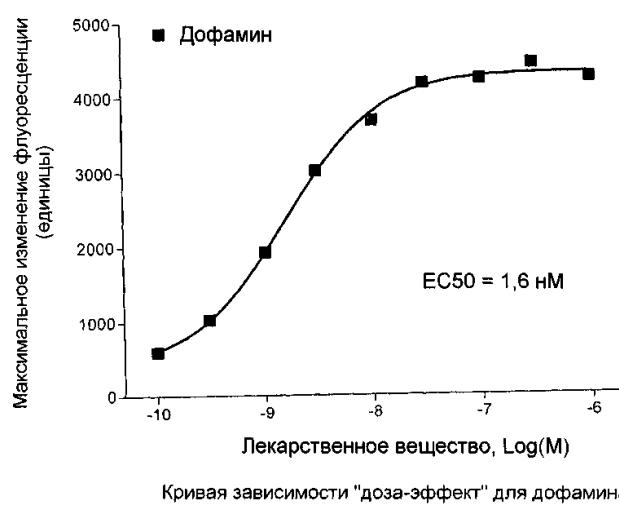
9. Фармацевтическая композиция по п.4, где R₁ и R₂ оба являются водородами и R₃ выбирают из группы, состоящей из водорода, метила, этила и н-пропила.

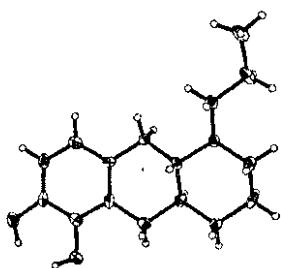
10. Фармацевтическая композиция по п.4, где R₁ и R₂ оба являются C₁₋₆алканоилом и R₃ выбирают из группы, состоящей из водорода, метила, этила и н-пропила.

11. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.1-10 или ее фармацевтически приемлемой кислотно-аддитивной соли для получения лекарственного средства для лечения нейродегенеративных расстройств у млекопитающего.

12. Применение фармацевтической композиции по п.11 для лечения болезни Паркинсона или болезни Хантингтона у млекопитающего.

13. Фармацевтически приемлемые соли соединения, где соединение выбирают из транс-1-метил-2,3,3a,4,9,9a-гексагидро-1H-бензо[f]индол-5,6-диола, цис-1-метил-2,3,3a,4,9,9a-гексагидро-1H-бензо[f]индол-5,6-диола, транс-1-н-пропил-2,3,3a,4,9,9a-гексагидро-1H-бензо[f]индол-5,6-диола, цис-1-н-пропил-2,3,3a,4,9,9a-гексагидро-1H-бензо[f]индол-5,6-диола.





Фиг. 2

Кристаллическая структура соединения примера 2d2. Абсолютную конфигурацию определяли на основании аномального рассеяния «тяжелого» атома брома.



Евразийская патентная организация, ЕАПО
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2